

УДК 616.71-003.9-018.4-089.843+615.463-032.548

## Экспериментально-морфологическое исследование местного влияния некоторых кальций-содержащих имплантатов на репаративный остеогенез

Т.Т. Шадманов<sup>1</sup>, Э.Ю. Валиев<sup>1</sup>, Б.А.Магруппов<sup>1</sup>, Р.Р. Ходжаев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Республиканский научный центр экстренной медицинской помощи МЗ РУз, Ташкент

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, МЗ РУз, Ташкент

*Purpose: study of the process of reparative regeneration of long bones in case of a local use of a natural mineral (white marble) in an experiment on rats. Methods: a comparative experimental-morphological study of the effect, produced by calcium-containing materials on activation of reparative osteogenesis, was conducted on 60 nonpedigreed white rats. Preparations were implanted into a diaphyseal defect of the femur; the material was studied on days 7, 14, 21, 30 and 60 after the operation. Results: it was found out that all tested materials facilitated formation of a neogenic bone on their surface; the most evident activation of reparative osteogenesis was observed after implantation of marble powder, a less degree was caused by calcium carbonate. Conclusion: marble powder implants are biocompatible, have osteoconductive properties and can be recommended for use in orthopaedic surgery for repairing bone tissue defects.*

*Мета: дослідження процесу репаративної регенерації довгих кісток у разі місцевого використання природного мінералу (білого мрамору) в експерименті на щурах. Методи: на 60 безпородних білих щурах проведено порівняльне експериментально-морфологічне дослідження впливу кальцієвмісних матеріалів на активізацію репаративного остеогенезу. Препарати імплантували у діафізарний дефект стегнової кістки, матеріал досліджували на 7, 14, 21, 30 та 60-у добу після операції. Результати: встановлено, що усі досліджені матеріали сприяють формуванню на їх поверхні новоутвореної кістки, але найбільш виражена активізація репаративного остеогенезу спостерігається у разі імплантації мармурової муки, у меншому ступеню — карбонату кальцію. Висновок: імплантат з мармурової муки є біосумісним, має остеокондуктивні властивості та може бути рекомендований для використання в ортопедичній хірургії з метою заміщення дефектів кісткової тканини.*

**Ключевые слова:** репаративный остеогенез, биodeградирующие материалы, мрамор

### Введение

Костная ткань — специализированный тип соединительной ткани с высокой минерализацией межклеточного органического вещества, представленного в основном белками коллагенового типа, содержит 60-70 % неорганических соединений, главным образом фосфатов кальция. Изучение новых биосовместимых материалов, необходимых для современных реконструктивных медико-биологических технологий, является актуальной проблемой современной медицины. Повышение эффективности лечения и качества жизни невозможно без внедрения в практику медицины технологий с применением новых материалов, способных воспроизводить функции живого организма [5, 8].

В последние десятилетия в медицине для лечения травм и дефектов костной ткани наряду с трансплантацией все шире используются альтернативные методы, связанные с применением имплантатов на основе металлов и синтетических материалов — полимеров, керамики, стеклокристаллических материалов, цементов, а также их композитов. Наиболее перспективную и стремительно развивающуюся группу материалов для ортопедии и травматологии представляют кальций-фосфатные и карбонатные материалы, поскольку их химический состав сходен с костной тканью.

Процесс ассимиляции такого имплантата в организме сопровождается его частичным или полным растворением, проникновением в имплантат

эндогенных протеинов, прорастанием кровеносных сосудов, ростом, размножением и делением клеток с образованием клеточной среды, заполняющей поры имплантата и, наконец, формированием искусственной кости [3, 6].

Для понимания механизма взаимодействия материалов и изделий из них с тканями организма необходимы глубокие исследования закономерностей ответа организма на инородное тело, характера регенераторного процесса, с одной стороны, и изучение «судьбы» (динамики биодеградации) имплантируемого материала — с другой.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в биотехнологии материалов в последние годы, пока не удалось создать материалы, полностью совместимые с живым организмом. Основными факторами, сдерживающими широкое применение остро востребованных биорезорбируемых полимерных материалов, является их небогатый ассортимент, а также пока не решенная проблема регулируемости процессов их функционирования и деструкции в живом организме [4].

В связи с этим перспективно использовать аллопластических материалов для замещения дефектов костной ткани и оптимизации репаративного остеогенеза.

Идея использования природных минералов исходит из данных о химическом составе кости. Белый мрамор является продуктом метаморфизации и перекристаллизации скоплений скелета тысяч мельчайших морских организмов. Его химический состав близок к составу неорганической фракции кости и является своего рода уникальной аналогией человеческих костей и костей млекопитающих, следовательно, может непосредственно влиять на формирование структуры костной ткани [7].

*Цель исследования:* изучение процесса репаративной регенерации длинных костей при местном использовании природного минерала (белого мрамора) в эксперименте.

## Материал и методы

Препарат для заполнения костных дефектов получали из белого мрамора путем дробления шаровой мельницей до размера частиц 0–50 мкм. Затем полученную мраморную муку стерилизовали, нагревая в сушильном шкафу при температуре 180°C в течение 40 мин. Хранили в затемненном стеклянном флаконе.

В эксперименте для сравнения использовали один из главных компонентов мрамора — синтетический CaCO<sub>3</sub> (Merck, Германия), который широко применяют в медицинской практике для

исправления мелких дефектов крупных костей (заполнение трещин либо после удаления небольших фрагментов).

Исследования проведены на 60 беспородных крысах в возрасте 5–6 месяцев, массой (210±30) г. Для опыта использованы животные, содержащиеся в условиях вивария. Исследование проводили натощак с 9-00 до 11-00. Уход и содержание экспериментальных животных были стандартные и соответствовали требованиям Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). На проведение эксперимента получено разрешение Национального этического комитета МЗ РУз (решение № 05/2 от 16.02.2011 г). Крыс содержали в условиях вивария экспериментального отдела при 12-часовом периоде освещения, комнатной температуре (20±2)° C, влажности 50–70%. Кормление животных осуществляли согласно установленному рациону с применением комбикорма для лабораторных крыс и мышей.

Животные были разделены на 3 группы (по 20 крыс):

*I группа* — контрольная, без имплантата, заживление дефекта — под сгустком крови (по 4 крысы на каждый срок исследования);

*II группа* — введение в место перелома мраморной муки;

*III группа* — введение в место перелома порошка CaCO<sub>3</sub>.

Область для формирования дефекта выбрана с учетом известных данных о том, что оптимальной моделью у крыс, позволяющей корректно оценить эффективность влияния на репаративный остеогенез имплантатов из различных материалов, является дефект костной ткани диаметром от 1,5 до 3,0 мм и глубиной от 1,0 до 3,5 мм [1, 2]. Для формирования дефекта костной ткани у животных под эфирным ингаляционным наркозом выполняли разрез кожи и мышц в проекции средней трети правого бедра. Тупым и острым путем обнажали бедренную кость на уровне средней трети. Далее с помощью шаровидной фрезы диаметром 2,5 мм проводили трепанацию бедренной кости с формированием дефекта диаметром 3,0 мм и глубиной до 2,5 мм с вскрытием костномозгового канала. Для контрольной группы операция на этом завершалась наложением швов на мышцы, фасцию и кожу, для других опытных групп рану закрывали после введения животным испытуемого вещества непосредственно в область дефекта кости. Анализировали общее состояние животных, опороспособ-

ность оперированной конечности, состояние тканей в месте операции.

На 7, 14, 30-е сутки, через 2 и 3 месяца после операции животных выводили из опыта путем декапитации. Затем выделяли бедренную кость, для макроскопической оценки делали снимок цифровой камерой, измеряли размер послеоперационного дефекта кости. Далее проводили рентгенографию макропрепарата. Динамику изменений и степень выраженности репаративного остеогенеза в зоне дефекта оценивали по 10-кратно увеличенным рентгенограммам визуально, с целью количественной оценки выполнен компьютерный анализ изображений на аппаратно-программном комплексе «ДиаМорф». На оцифрованных изображениях рентгенограмм, выполненных на этапах эксперимента, оконтуривали тени дефектов. Измеряли среднюю интенсивность мягких тканей и фона изображений. Полученные данные использовали для расчета оптической плотности (ОП) по формуле:

$$ОП = \lg \left( \frac{I_d - I_{MT}}{I_\Phi} \right),$$

где: ОП — оптическая плотность (у.е.);  $I_d$  — средняя интенсивность тени дефекта (у.е.);  $I_{MT}$  — средняя интенсивность тени мягких тканей (у.е.);  $I_\Phi$  — средняя интенсивность фона изображения рентгенограммы (у.е.).

Для последующего морфологического исследования материал (бедренная кость) фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина (рН 7,2–7,4), декальцинировали в 5% растворе азотной кислоты, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон и изучали в светооптическом микроскопе. Анализ и фотографирование гистологических препаратов проводили с помощью светового микроскопа («Carl Zeiss»).

Проводили описательный и полуколичественный анализ с учетом факторов, отражающих регенерацию кости: восстановление кортикальной пластинки, коллагеновые волокна, воспалительный инфильтрат и формирование новой кости. Система записи была следующей: коллагеновые волокна, воспалительный инфильтрат и формирование новой кости: 0 — отсутствует, 1 — слабо выражено, 2 — умеренное, 3 — ярко выражено. Восстановление кортикальной пластинки: 0 — отсутствует, 1 — нечеткий контур краев, 2 — покрыто около 50% ширины фрагмента, 3 — покрыто более 50% ширины фрагмента. Срезы оценивались одним исследователем, обладающим соответствующим опытом в области оценки гистологических срезов кости.

Обработка полученных результатов проведена с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Находили средние арифметические варианты и ошибки среднего. Достоверность отличия средних значений в контрольных и экспериментальных группах проверяли в зависимости от величины выборки по t- критерию Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

Через 6 часов после операции животные выходили из состояния наркоза, а уже через сутки принимали пищу, активно передвигались по клетке, щадя оперированную конечность, держа ее на весу, на 2–3-и сутки пытались опираться на нее. Большинство животных через 3–4 суток начинали опираться на оперированную конечность при стоянии и при ходьбе, через 7–10 суток свободно пользовались ею. Послеоперационные раны заживали первичным натяжением. Аллергических реакций, нагноения ран и других осложнений у животных не наблюдали.

По данным компьютерного анализа изображений рентгенограмм, средняя ОП тени неповрежденного участка диафиза составляла  $(0,25 \pm 0,01)$  у.е. Этот показатель был принят за норму для сравнения со значениями ОП теней зоны дефекта на этапах эксперимента.

Изучение на 7-й день после операции показало, что рентгенологически в бедренных костях лабораторных животных во всех группах визуализировались костные дефекты в виде правильного круга с четкими ровными краями (рис. 1). Дефект во всех группах выглядит заполненным легкой гомогенной тенью. ОП тени зоны дефекта во всех группах были значительно снижены по сравнению с ОП непо-

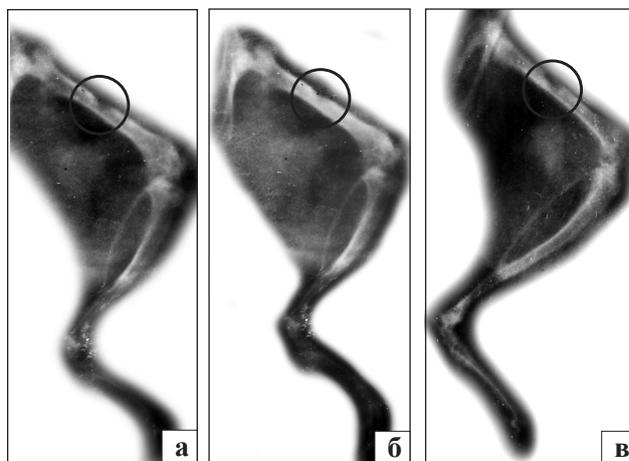
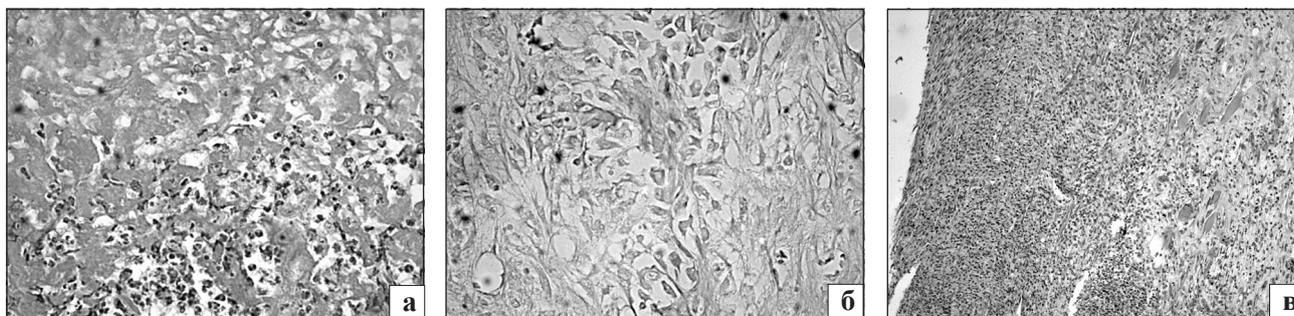


Рис. 1. Фотоотпечаток рентгенограмм конечности животного на 7-е сутки после операции: а) контроль; б) мраморная мука; в) карбонат кальция

**Таблица 1.** Размер дефекта бедренной кости крыс (в мм) на разных сроках наблюдения после операции

Срок наблюдения	Группы животных		
	Контроль	Мраморная мука	Кальция карбонат
7 дней	3,0±0,03	2,8±0,02	3,0±0,01
14 дней	2,2±0,02	1,6±0,01	2,0±0,01
30 дней	1,2±0,03	0,3±0,01	0,5±0,02
60 дней	0,3±0,02	0,3±0,02	0,5±0,03

**Рис. 2.** Фото гистопрепарата области дефекта костной ткани в группах на 7-е сутки после операции: а) контроль, ок. 10, об. 40, гематоксилин и эозин; б) мраморная мука, ок. 10, об. 40, пикрофуксин по Ван-Гизон; в) карбонат кальция, ок. 10, об. 10, гематоксилин и эозин

врежденного участка диафиза. При этом во всех группах ширина диапазона оптических плотностей минерализованных структур заключалась в границах от 0 до 0,45 у.е. У животных контрольной группы большую часть (86,5%) зоны дефекта занимали структуры с ОП от 0 до 0,15 у.е., в III группе доля структур с ОП от 0,16 до 0,30 у.е. составляла 60%, а во II группе животных значительная доля (79%) площади зоны дефекта приходилась на структуры с ОП от 0,16 до 0,30 у.е. Кроме того, в этой группе на данном этапе эксперимента уже появлялись структуры с ОП от 0,31 до 0,45 у.е., доля которых в площади зоны дефекта составляла 3%.

В течение 7 дней после создания модельного дефекта бедренной кости его размер достоверно уменьшается только во II группе животных (табл. 1).

В контрольной группе через неделю после операции в зоне дефекта кости определялись остатки кровяного сгустка (рис. 2 а). При использовании мраморной муки в зоне перелома выявлялась рыхлая соединительная ткань с тонкими коллагеновыми волокнами (рис. 2 б). В группе с введением по-

рошка  $\text{CaCO}_3$  определялась рыхлая соединительная ткань и формирование гранул как реакция на инородное тело (рис. 2 в, табл. 2).

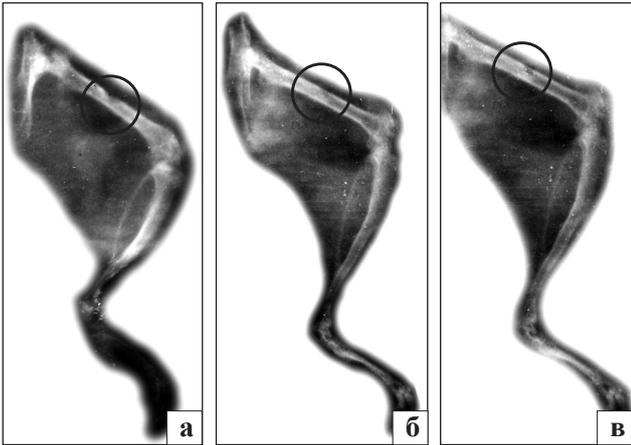
Через 14 дней после операции дефекты кости во всех группах оставались заметными. Их края размыты, местами плохо прослеживаются, форма утратила первоначальную правильность. В просвете дефектов визуализировались бесструктурные тени, неравномерно покрывающие их поля (рис. 3). Значимое превалирование ОП тени зоны дефекта во II группе сохранялось и на 14-е сутки эксперимента. У животных контрольной группы минерализованные структуры с ОП от 0,31 до 0,45 у.е. лишь только появлялись. Их доля в площади зоны дефекта составляла 3%, в то время как во II и III группах их доля составляла 8% и 5% соответственно. Одновременно в группе контроля до 80% увеличивалась доля структур с ОП от 0,16 до 0,30 у.е., а во II и III группах составляла 90% и 85% соответственно.

Через 2 недели после операции во всех группах наблюдения дефект кости заполнен массивом

**Таблица 2.** Изменения структуры регенерата (в баллах) бедренной кости крыс в зависимости от срока наблюдения

Срок наблюдения	Группы животных											
	Контроль				Мраморная мука				Кальция карбонат			
	1*	2*	3*	4*	1*	2*	3*	4*	1*	2*	3*	4*
7 дней	0	2	3	0	0	3	2	1	0	2	3	1
14 дней	0	3	1	0	0	2	0	2	0	3	0	1
30 дней	1	1	0	1	1	0	0	3	1	0	0	2
60 дней	2	0	0	2	3	0	0	3	2	0	0	3

Примечания: 1\* – восстановление кортикальной пластинки; 2\* — коллагеновые волокна; 3\* — воспалительный инфильтрат; 4\* — формирование новой кости



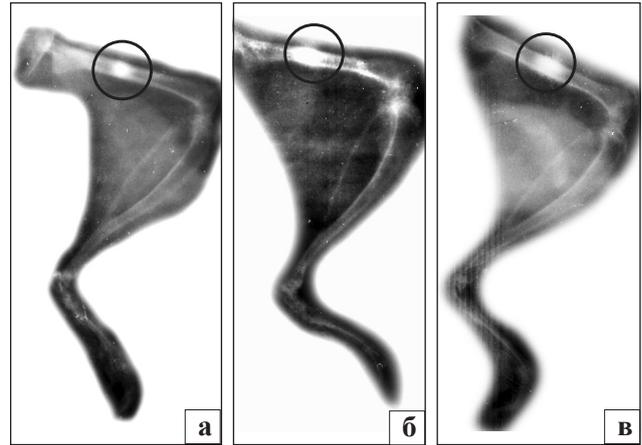
**Рис. 3.** Фотоотпечаток рентгенограмм конечности животного на 14-е сутки после операции: а) контроль; б) мраморная мука; в) карбонат кальция

коллагеновых волокон (табл. 2). В ответ на травму в пластическую реакцию вовлекаются главным образом мигрирующие клетки крови и местные соединительнотканые элементы, поэтому развитие клеточного пролиферата происходит за счет периоста и прилегающих мягких тканей.

В период с 8-го до 14-го дня опыта размер отверстия во всех группах заметно уменьшается, причем во 2-й группе отмечается минимальный диаметр дефекта (табл. 1).

Картина остеорепарации по своему структурному выражению подобна во всех группах наблюдения. Однако во II группе животных коллагеновые волокна, заполняющие дефект кости, формируют плотные сплетения. В областях костного дефекта с низкой оксигенацией вследствие слабо протекающего ангиогенеза формируются поля хондроиды (рис. 4, табл. 2).

Через месяц после операции существенно увеличивалась ОП тени зоны перелома во II группе. Она заметно превышала соответствующие показатели в I и III группах. Значительное изменение ОП тени зоны перелома у животных II группы было связано



**Рис. 5.** Фотоотпечаток рентгенограмм конечности животного через 1 мес после операции: а) контроль; б) мраморная мука; в) карбонат кальция

с появлением минерализованных структур с ОП от 0,61 до 0,75 у.е. (рис. 5, табл. 1, 2).

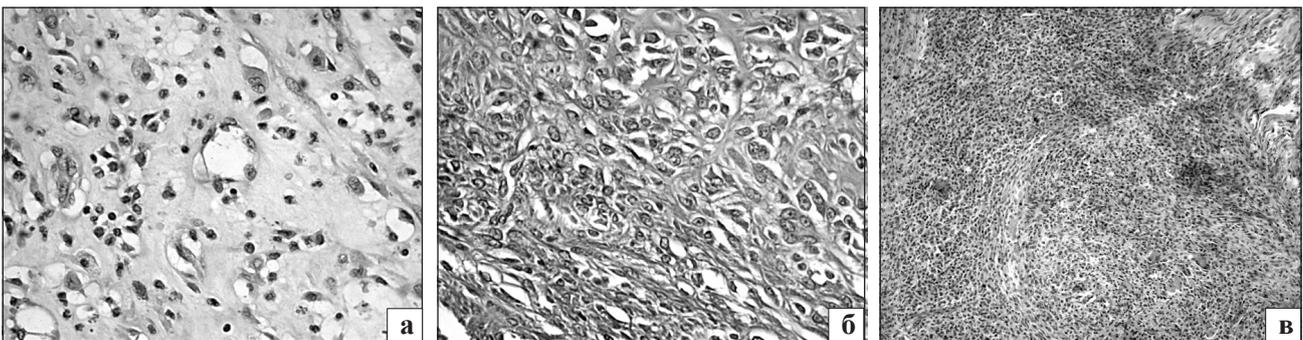
Морфологическое исследование показало, что во всех группах у животных в области костного дефекта преобладает костно-хрящевой регенерат.

Новообразованный остеонд формировался непосредственно на дне созданного дефекта. Признаков воспаления в виде повышенной нейтрофильной или макрофагальной инфильтрации в области травматического повреждения не выявлено.

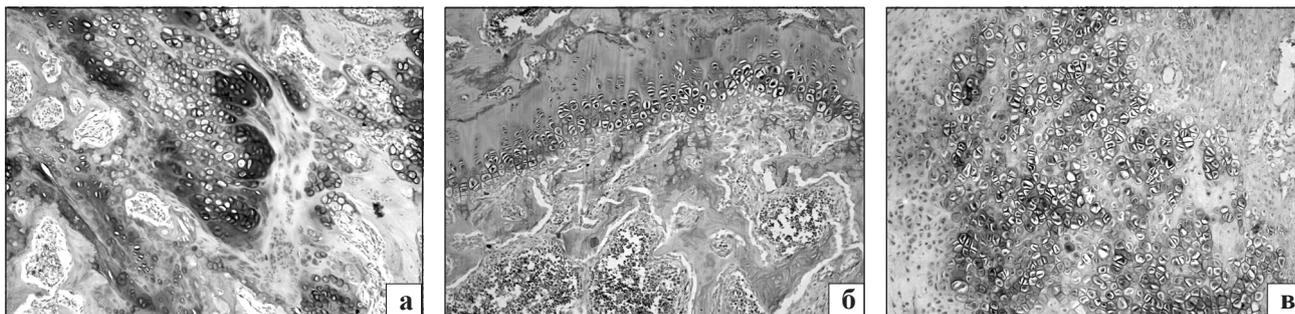
Отличительной особенностью в группе животных с использованием мраморной муки явилось более активное формирование костной ткани, костные трабекулы которой занимали большую площадь и имели зрелый характер (рис. 6).

В период с 15-го до 30-го дня опыта размер отверстия во II и III группах практически закрывается новообразованной тканью (табл. 1).

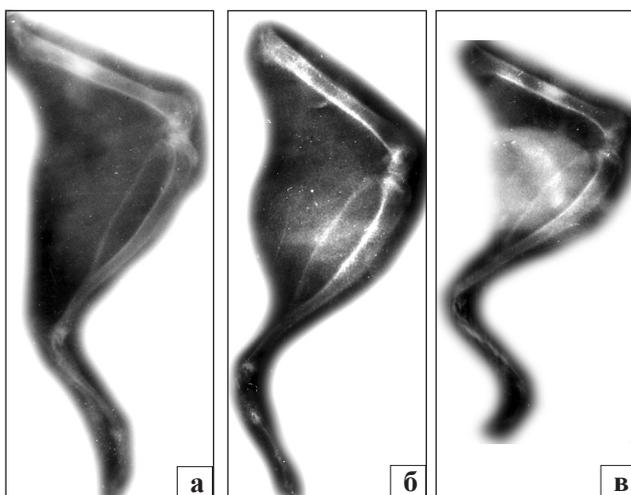
К концу эксперимента (60 суток) отверстие полностью закрывается во всех группах животных. Во всех группах происходило снижение (во II группе значительное) ОП тени дефекта до 0,3 у.е. по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Просле-



**Рис. 4.** Фото гистопрепарата области дефекта костной ткани в группах на 14-е сутки после операции, окраска гематоксилином и эозином: а) контроль, ок. 10, об. 40; б) мраморная мука, ок. 10, об. 40; в) карбонат кальция, ок. 10, об. 10



**Рис. 6.** Фото гистопрепарата области дефекта костной ткани в группах через 1 мес после операции, окраска гематоксилином и эозином: а) контроль, ок. 10, об. 40; б) мраморная мука, ок. 10, об. 10; в) карбонат кальция, ок. 10, об. 10



**Рис. 7.** Фотоотпечаток рентгенограмм конечности животного через 2 мес после операции: а) контроль; б) мраморная мука; в) карбонат кальция

живалось формирование мозгового канала за счет резорбции эндостального регенерата и заполнения мозгового канала в зоне репаративного остеогенеза (рис. 7, табл. 1, 2).

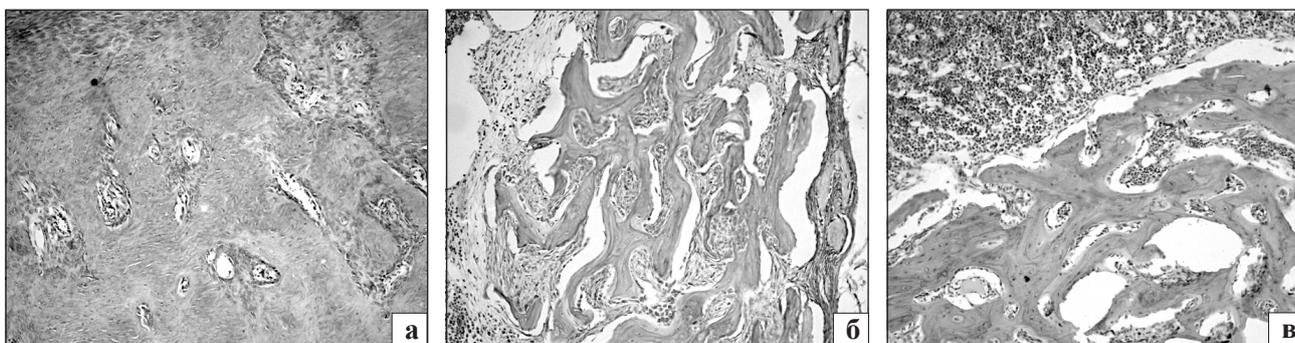
При микроскопическом исследовании через 2 месяца после операции в области костного дефекта выявлены признаки формирования пластинчатой кости, что наиболее выражено во II группе животных. Если в контрольной группе животных

при развитом периостальном регенерате выявлялись лишь незначительно выраженные признаки формирования интермедиарного костного регенерата различной зрелости (рис. 8 а), то во II группе регенерат был представлен многочисленными костными трабекулами, имеющими пластинчатое строение. В некоторых участках регенерата костные трабекулы формировали мелкопетлистую сеть (рис. 8 б). При использовании порошка  $\text{CaCO}_3$  в этот срок эксперимента образующаяся кость имела также трабекулярное строение, но была представлена тонкими костными трабекулами, между которыми располагались расширенные межтрабекулярные пространства (рис. 8 в).

### Заключение

Динамика размера дырчатых дефектов кости, ОП теней, морфологическая картина в группах сравнения показала, что введение мраморной муки заметно ускорило заполнение костного дефекта костной тканью по сравнению с контрольной группой и группой, в которой использовали обычный карбонат кальция.

Таким образом, при заполнении костных дефектов трубчатых костей мраморной мукой происходит достоверно отмеченная активация репаративного остеогенеза. Имплантаты из мраморной муки являются биосовместимыми. Они подвергаются



**Рис. 8.** Фото гистопрепарата области дефекта костной ткани в группах через 2 мес после операции, окраска гематоксилином и эозином: а) контроль, ок. 10, об. 10; б) мраморная мука, ок. 10, об. 10; в) карбонат кальция, ок. 10, об. 10

биорезорбции и обладают osteoconductive свойствами. В связи с этим биоматериал может быть рекомендован для применения в ортопедической хирургии с целью замещения дефектов костной ткани и оптимизации процесса репаративного остеогенеза.

## Литература

1. Разработка и обоснование экспериментальной модели для изучения влияния различных костно-пластических материалов на остеогенез / И.Г. Арсеньев, Г.А. Кесян, Р.З. Уразгильдеев и др.: сборник тезисов научно-практ. конф. молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины». — СПб, 2005. — С. 379–381.
2. Поиск экспериментальной модели для изучения особенностей репаративного остеогенеза. Клинические и фундаментальные аспекты тканевой терапии. Теория и практика клеточных биотехнологий / И.Г. Арсеньев, Г.А. Кесян, Р.З. Уразгильдеев и др.: материалы II Всерос. симп. с междунар. участием. — Самара, 2004. — С. 17–18.
3. Композиционные биodeградируемые материалы для регенерации костной ткани. Биоматериалы в медицине / А.А. Артюхов, М.И. Штильман, Л.И. Пашкова, Ю.С. Лукина: тез. докл. Всерос. совещ. — М., 2009. — С. 11–12.
4. Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование влияния некоторых используемых в травматолого-ортопедической практике кальций-фосфатных материалов на активизацию репаративного остеогенеза / Г.Н. Берченко, Г.А. Кесян, Р.З. Уразгильдеев и др. // Бюл. Восточно-сибирского научного центра Сиб. отделения РАМН. — 2006. — № 4. — С. 327–332.
5. Волова Т.Г. Биотехнология новых полимерных материалов: синтез, свойства, применение. Очерки экологической биофизики / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая. — Новосибирск: Наука, 2003. — С. 106–119.
6. Использование ВМР 2 для создания композиционных препаратов нового поколения. Биоматериалы в медицине / А.С. Семихин, В.Г. Лунин, А.С. Карягина и др.: тез. докл. Всерос. совещ. — М., 2009. — С. 61–62.
7. Изучение общетоксического действия мраморной муки на экспериментальных животных / Т.Т. Шадманов, Б.А. Магрупов, Р.Р. Ходжаев, Х.У. Алиев // Фармацевт. журнал. — 2010. — № 1. — С. 63–67.
8. Шишацкая Е.И. Биоактивные имплантаты на основе резорбируемых полиэфиров и гидроксиапатита для реконструктивного остеогенеза / Е.И. Шишацкая: 3-й Междунар. биотехнол. конгресс «Bio-2007». — Москва, 2006. — С. 136.

Статья поступила в редакцию 28.02.2011